

Применение ВЭЖХ-МС/МС для определения некоторых инсулиноподобных факторов мышечного роста

А.З. Темердашев*¹, А.В. Горшенина¹, Е.В. Светличная², А.В. Лабутин³

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,
Российская Федерация, 350055, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149

²ФБУЗ «Наркологический диспансер»,
Российская Федерация, 350080, г. Краснодар, ул. Тюляева, д. 18

³Томский наркологический диспансер,
Российская Федерация, 634000, г. Томск, ул. Лебедева, д. 4

*Адрес для переписки: Темердашев Азамат Зауалевич, E-mail: TemerdashevAZ@gmail.com

Поступила в редакцию 24 марта 2016 г., после исправления – 13 апреля 2016 г.

Активное развитие протеомики и геномики приводит к все большему пониманию проблемы изучения и разработки терапевтических средств на основе пептидов. В последние годы получил широкое распространение ряд низкомолекулярных пептидов, используемых в качестве факторов мышечного роста и официально включенных в список запрещенных ВАДА препаратов. Отдельно стоит отметить, что большинство из них не проходили клинических испытаний и могут быть потенциально опасными для здоровья употребляющих их людей. Рассмотрены наиболее распространенные способы определения некоторых низкомолекулярных инсулиноподобных факторов мышечного роста с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Показано, что наибольшая эффективность разделения достигается с использованием метода обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, при этом предел обнаружения составляет 5 нг/мл. Предложен способ определения некоторых инсулиноподобных факторов мышечного роста с использованием ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС в режиме “Wrong-way round ionization”, обеспечивающим аналогичную чувствительность. В данном режиме ионизация осуществляется в щелочной среде с регистрацией положительных ионов, несмотря на отсутствие явного источника протонов, путем переноса протона из иона аммония в газовой фазе. Показано существенное изменение параметров удерживания определяемых веществ за счет изменения их формы нахождения в анализируемой пробе. Рассмотрена возможность применения гидрофильной хроматографии для разделения изучаемых низкомолекулярных пептидов. Установлено, что в случае применения HILIC возможно определение количества пептидов.

Ключевые слова: пептиды, ВЭЖХ-МС/МС, допинг, “Wrong-way round ionization”, HILIC.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2016, vol. 20, no. 2, pp. 154-160

DOI: 10.15826/analitika.2016.20.2.003

Wrong-way-round ionization and hydrophilic liquid chromatography in the analysis of insulin-like growth factors

A.Z. Temerdashev*¹, A.V. Gorshenina¹, E.V. Svetlichnaya², A.V. Labutin³

¹Kuban State University, Stavropolskaya ul., 149, Krasnodar, 350055, Russian Federation

²Krasnodar narcological dispensary, Tulaeva ul., 18, Krasnodar, 350080, Russian Federation

³Tomsk narcological dispensary, Lebedeva ul., 4, Tomsk, 634000, Russian Federation

*Corresponding author: Azamat Z. Temerdashev, E-mail: TemerdashevAZ@gmail.com

Submitted 24 March 2016, received in revised form 13 April 2016

The recent advances in genomics and proteomics have led to an increased focus on the development of peptide therapeutics. For the last few years the usage of several low molecular weight peptides, included in WADA prohibited list, has increased dramatically. Most of them had never passed a clinical trial, and potentially can be dangerous for people. In this article, we developed a few methods of determination of several low molecular weight insulin-like growth hormones using UPLC-MS/MS. It was shown that reversed-phase liquid chromatography is the most preferred method for their separation, which can be used to achieve a 5 ng/ml

limit of detection using the outlined separation and detection conditions. Wrong-way-round ionization UPLC-ESI-MS/MS method for the determination of some insulin-like human growth hormones was developed with the same sensitivity. This method can be realized in alkaline conditions with the detection of positive ions and despite the apparent lack of protons' source, which can be taken from the ammonia ion in the gas phase. A significant change in the retention parameters was shown because of their forms of occurrence changing in the analyzed sample. The possibility of using hydrophobic interaction chromatography to separate low molecular weight peptides was studied. It was found that in the case of using HILIC it may define a limited number of peptides.

Keywords: peptides, HPLC-MS/MS, doping, "Wrong-way round ionization", HILIC.

Введение

До недавнего времени наиболее популярными классами соединений, применяющихся для мышечного роста, являлись анаболические стероиды, прогормоны [1], а также традиционные факторы мышечного роста, например, инсулин [2]. Однако за последние 10 лет активно развивается направление по получению искусственных факторов мышечного роста, например, низкомолекулярных пептидов с молекулярной массой до 5 кДа. Среди этих соединений особую популярность получили пептиды, относящиеся к группе релизинг-пептидов гормона роста (Growth Hormone Releasing Peptide, **GHRP**), благодаря их высокой стимулирующей активности [3], а также способности маскировать незаконное применение рекомбинантного гормона роста [4]. Данные соединения имеют сходную структуру, в их состав входит С-концевая группа, которая представляет собой биоактивный центр этих пептидов [5-7]. Из-за их специфической структуры и низкой ММ (менее 1 кДа) пептиды способны легко проникать через слизистую оболочку.

Несмотря на достоинства данного класса соединений, клинические испытания прошло в 2004 году и используется в медицинских целях только одно соединение – GHRP-2. Остальные соединения группы GHRP не проходили клинических испытаний, однако GHRP-2, GHRP-6, ипаморелин и гексарелин на сегодняшний день активно применяются, в том числе и в качестве допинга, и не подлежат контролю со стороны правоохранительных органов [8].

Основными методами определения этих соединений в настоящее время являются ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения. Применение ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения особенно распространено в случае определения пептидов в биологических жидкостях, особенно в режиме нанопотоковой жидкостной хроматографии [9–12], позволяющей добиться максимальной эффективности ионизации, а также существенно повышающей чувствительность определения благодаря возможности определения точных масс аналитов, что особенно важно в случае аналитов, имеющих достаточно близкие молекулярные массы, отличающиеся не более, чем на 1 Да (например, меланотан-2 и РТ-141).

В случае установления подлинности и чистоты препаратов наиболее популярными являются методы ВЭЖХ-УФ и, в ряде случаев, ВЭЖХ-МС/МС, поскольку в большинстве случаев не требует-

ся определения следовых и ультраследовых количеств веществ [10, 13].

Целью настоящей работы являлась изучение различных способов хромато-масс-спектрометрического определения некоторых низкомолекулярных пептидов, используемых в качестве факторов мышечного роста.

Экспериментальная часть

Разделение компонентов осуществляли с использованием УВЭЖХ-системы Thermo Ultimate-3000 с tandemным масс-спектрометрическим детектором Thermo TSQ Quantum Access Max с источником нагреваемой электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов на аналитических колонках Waters Acquity BEH C18 (75×2.1 мм, 1.7 мкм) и Thermo Accucore HILIC (75×2.1 мм, 2.6 мкм). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил квалификации «для ВЭЖХ-МС» (Biosolve, Израиль), раствор аммиака в воде (pH = 10) и 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в воде. Стандартные образцы пептидов (табл. 1) приобретали у ST Biotechnology Co. Ltd. (Китай). Элюирование градиентное, двуступенчатое. Условия элюирования приведены в табл. 2 и табл. 3, условия детектирования – в табл. 4.

Результаты и их обсуждение

На сегодняшний день гидрофильная жидкостная хроматография имеет широкое распространение и продолжает активно использоваться исследователями для решения новых задач и широко применяется в рутинном анализе. В ряде случаев её применение позволяет добиться существенного повышения чувствительности при применении масс-спектрометрического детектирования, поскольку в этих условиях основным компонентом подвижной фазы является ацетонитрил.

Разделение исследуемых низкомолекулярных пептидов в режиме гидрофильной хроматографии, как видно из хроматограммы (рис. 1), не позволяет добиться необходимых результатов – формы получаемых пиков неудовлетворительны, несмотря на проведенную оптимизацию условий анализов, а некоторые из них и вовсе не элюировались. При этом оптимизацию условий разделения осуществляли как по составу подвижной фазы (соотношению компонентов), так и по профилю кривой градиентного элюирования. Несмотря на это лучшей формы пиков

Таблица 1

Структуры и молекулярные массы определяемых веществ

Table 1

Structures and molecular weights of analytes

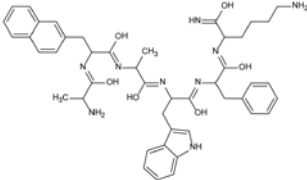
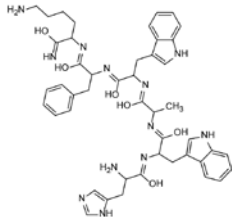
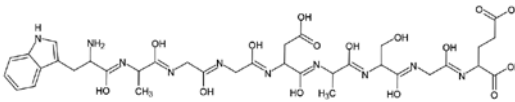
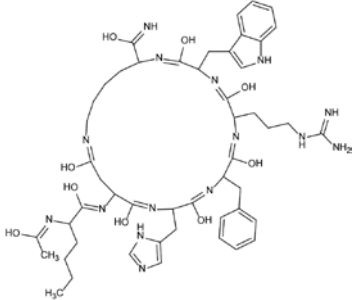
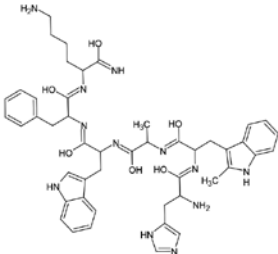
Название	Аминокислотная последовательность	Молекулярная масса, Да	Структура
GHRP-2	Ala-beta-Nal-Ala-Trp-Phe-Lys-NH ₂	817.4275	
GHRP-6	His-Trp-Ala-Trp-Phe-LysNH ₂	872.4446	
DSIP	Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu	848.3300	
Меланотан-2	Ac-Nle-c[Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys]-NH ₂	1023.5403	
Гексарелин	His-D-2-methyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	886.4602	

Таблица 2

Условия градиентного элюирования в режиме ОФ-ВЭЖХ

Table 2

Gradient elution conditions in RP-HPLC mode

Время, мин	А (ацетонитрил), % об.	В (0.1% р-р муравьиной кислоты / 1% р-р аммиака), % об.	Скорость потока, мл/мин
0	5	95	0.45
1	5	95	
2.5	20	80	
3.5	30	70	
5	90	10	
7.5	90	10	
7.8	10	90	
9	10	90	

Таблица 3

Условия градиентного элюирования в режиме гидрофильной хроматографии

Table 3

Gradient elution conditions in HILIC mode

Время, мин	А (ацетонитрил), % об.	В (0.1% р-р муравьиной кислоты), % об.	Скорость потока, мл/мин
0	95	5	0.5
0.6	95	5	
1.6	50	50	
5.6	50	50	
5.8	95	5	
8.5	95	5	

Таблица 4

Условия детектирования аналитов с использованием ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС

Table 4

Conditions of analytes' detection using HPLC-ESI-MS / MS

Параметр	Значение
Температура испарителя	350 °С
Температура трансферного капилляра	270 °С
Напряжение на источнике ионизации	3500 В
Режим регистрации ионов	Положительный
Давление газа-распылителя	12 л/мин
Давление вспомогательно-го газа	3 л/мин
Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона)	0.2 Па

и эффективности разделения с использованием данного сорбента добиться не удалось.

Традиционным методом разделения подобных соединений является обращенно-фазовая жидкостная хроматография. При этом, в зависимости от свойств аналита, могут меняться как условия разделения, так и способ детектирования.

При проведении исследований нами использованы оба варианта разделения: традиционный вариант регистрации положительных ионов с использованием кислой подвижной фазы (система 1) (рис. 2), и регистрация положительных ионов с использованием подщелоченной подвижной фазы (система 2) (рис. 3). В последнем случае в растворе отсутствует явный источник избыточного количества протонов, поэтому возможность получения протонированных ионов не является очевидной. В работе [14] рассмотрен механизм образования протонированных форм аналитов в описанных выше условиях, результатом чего стало предположение, что ионизация происходит путем переноса протона в газовой фазе из иона аммония. Ранее группой авторов [15] была продемонстрирована возможность применения данного способа в целях определения ряда кортикостероидов, диуретиков, стимуляторов, бета-блокаторов и анаболиков, представляющих интерес в допинг-контроле. Предлагаемый способ разделения не только позволяет существенно изменить параметры удерживания за счет изменения формы нахождения вещества в растворе (рис. 3), но и дает возможность получения монозарядных молекулярных ионов. При применении в качестве одного из компонентов подвижной фазы подкисленных растворов большинство изучаемых соединений образует ряд ионов: как монозарядных, так и

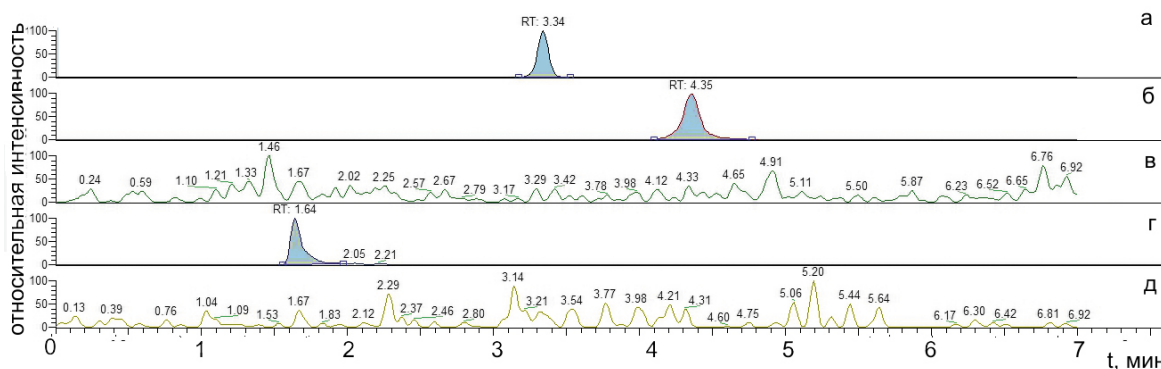


Рис. 1. Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в режиме гидрофильной хроматографии: а) меланотан-2; б) GHRP-2; в) GHRP-6; г) DSIP; д) гексарелин

Fig. 1. RIC-chromatogram of the peptides mixture in the HILIC mode: а) melanotan-2; б) GHRP-2; в) GHRP-6; д) DSIP; е) hexarelin

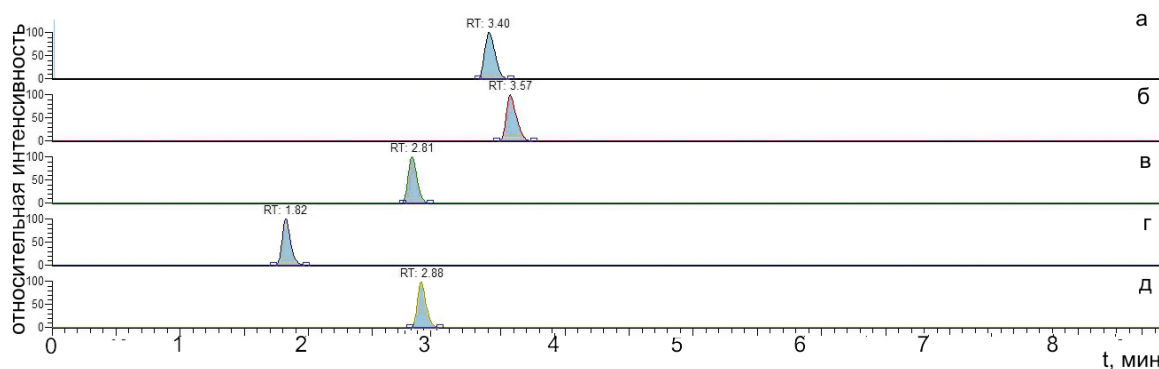


Рис. 2. Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в кислой среде (pH = 2.5): а) меланотан-2; б) GHRP-2; в) GHRP-6; г) DSIP; д) гексарелин

Fig. 2. RIC-chromatogram of the peptides mixture in acidic mobile phase (pH = 2.5): a) melanotan-2; b) GHRP-2; c) GHRP-6; d) DSIP; e) hexarelin

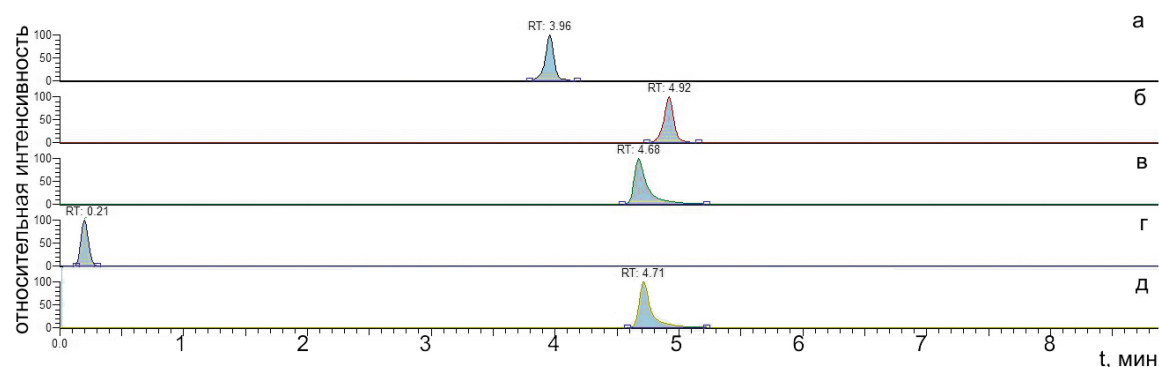


Рис. 3. Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в щелочной среде (pH = 10): а) меланотан-2; б) GHRP-2; в) GHRP-6; г) DSIP; д) гексарелин

Fig. 3. RIC-chromatogram of the peptides mixture in alkaline mobile phase (pH = 2.5): a) melanotan-2; b) GHRP-2; c) GHRP-6; d) DSIP; e) hexarelin

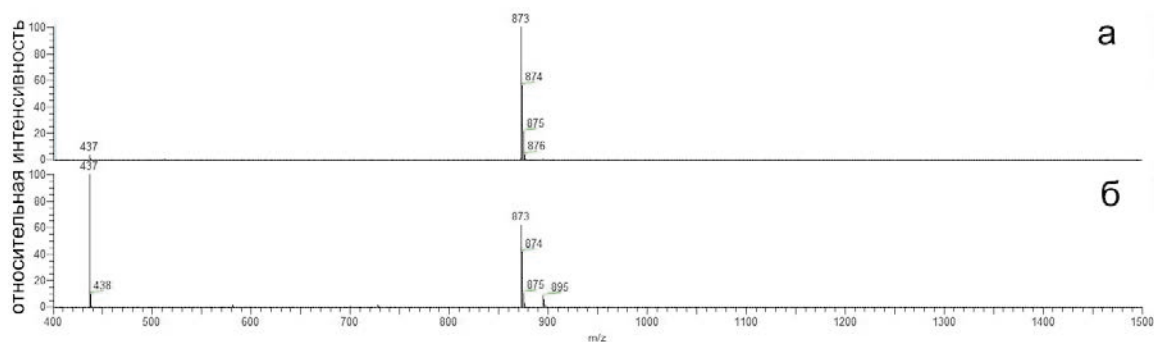


Рис. 4. Масс-спектры пептида GHRP-6 в щелочной (а) и кислой среде (б)

Fig. 4. GHRP-6 mass-spectra in alkaline (a) and acidic (b) conditions

двузарядных. При этом оба способа обеспечивали идентичную чувствительность: предел обнаружения составил 5 нг/мл.

С другой стороны, использование способа “Wrong-way round ionization” ограничено возможностью применения большинства сорбентов в щелочной среде. Существенное отличие форм пиков, полученных при разделении в кислой и щелочной среде, отчасти объясняется тем, что программа градиентного элюирования для щелочной среды не менялась для сохранения возможности сопоставления параметров

удерживания аналитов при формально одинаковой силе элюента, обусловленной объемной долей ацетонитрила в составе подвижной фазы в обоих случаях.

Другой интересной особенностью применения данного метода является возможность получения преимущественно монозарядного иона для ряда аналитов, склонных к образованию полизарядных ионов (рис. 4), что, в ряде случаев, может положительно сказаться как на точности анализа, так и его надежности при использовании масс-спектрометрического

детектирования. Следует отметить, что применение данного метода существенно ограничено верхним диапазоном масс применяемого прибора и может привести к невозможности его применения.

Анализ приведенных в табл. 1 структур аналитов и их молекулярных масс показывает, что исследуемые пептиды являются низкомолекулярными и их определение на современных ВЭЖХ-МС/МС системах с использованием предлагаемого способа не вызовет затруднений.

Предложенные методики были апробированы на образцах пептидов, приобретенных в интернет-магазине. Пробы готовили путем разбавления содержимого флакона с помощью 0.1 % об. раствора муравьиной кислоты для анализа с использованием системы 1. Во всех приобретенных образцах были обнаружены заявленные пептиды, что говорит о легкости доступности данных соединений.

Таким образом, для проведения исследований низкомолекулярных пептидов наиболее целесообразным представляется применение методов ОФ-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и регистрацией положительных ионов, как в режиме "Wrong-way round ionization", так и в традиционной схеме реализации с подкислением подвижной фазы, применение которого представляется более предпочтительным, ввиду большей универсальности и отсутствия дополнительных требований к хроматографической системе.

Благодарности

Исследования проводились в рамках выполнения проектов Государственного Задания Минобрнауки РФ (проект № 4.873.2014/К) и РФФИ (проекты № 16-43-230404 p_a и № 15-03-02453 А), на научном оборудовании ЦКП КубГУ.

Acknowledgements

The Ministry of Education of the Russian Federation (Project № 4.873.2014 / K) and RFBR (projects № 16-43-230404 r_a and № 15-03-02453 A) supported this work, which was completed using the scientific CCU KubSU equipment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / O.J. Pozo [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 389. P. 1209-1224.
2. Sensitive and fast identification of urinary human, synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry / A. Thomas [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2009. V. 1. P. 219-227.
3. Effects of GHRP-2 and hexarelin, two synthetic GH-releasing peptides, on GH, prolactin, ACTH and cortisol levels in man. Comparison with the effects of GHRH, TRH and hCRH / E. Arvat [et al.] // *Peptides*. 1997. V. 18. P. 885-891.

4. Influence of intravenous administration of growth hormone releasing peptide-2 (GHRP-2) on detection of growth hormone doping: Growth hormone isoform profiles in Japanese male subjects / Okano M. [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2010. V. 2. P. 548-556.
5. Growth hormone-releasing peptides / E. Ghigo [et al.] // *Europ. J. Endocrinol.* 1997. V. 136. P. 445-460.
6. Plasma growth hormone (GH) responses after administration of the peptidergic GH secretagogue KP102 into the oral cavity, rumen, abomasum and duodenum in adult goats / T. Hashizume [et al.] // *Domestic animal endocrinol.* 2001. V. 2001. P. 37-46.
7. Drugs-Potential for misuse in sport and doping control detection strategies / M. Thevis [et al.] // *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2007. V. 7. P. 533-539.
8. The World Anti-Doping Code. The 2016 Prohibited List. International Standard for Laboratories. [Электронный ресурс]: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2016-prohibited-list-en.pdf> (дата обращения 22.03.2016).
9. Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin / E. Semeništya [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2015. V. 7. P. 919-925.
10. Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement / A. Thomas [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2010. V. 2. P. 144-148.
11. Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry / A. Thomas [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2012. V. 1259. P. 251-257.
12. Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry / A. Thomas [et al.] // *Analyt. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. P. 507-516.
13. Identification and quantification of the doping agent GHRP-2 in seized unlabelled vials by NMR and MS: a case-report / M. C. Gaudiano [et al.] // *Drug Test. Anal.* 2014. V. 6. P. 295-300.
14. Protonation in Electrospray Mass Spectrometry: Wrong-Way-Round or Right-Way-Round? / S. Zhou, K. D. Cook // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000. V. 11. P. 961-966.
15. 'Wrong-way-round ionization' and screening for doping substances in human urine by highperformance liquid chromatography/orbitrap mass spectrometry / E. D. Virus, T. G. Sobolevsky, G. M. Rodchenkov // *J. Mass. Spectrom.* 2012. V. 47. P. 381-391.

REFERENCES

1. Pozo O.J., Eenoo P.V., Deventer K., Delbeke F.T. [Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, vol. 389, pp. 1209-1224. doi: 10.1007/s00216-007-1530-6.
2. Thomas A., Schänzer W., Delahaut P., Thevis M. [Sensitive and fast identification of urinary human, synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry]. *Drug Testing and Analysis*, 2009, vol. 1, pp. 219-227. doi: 10.1002/dta.35.
3. Arvat E., Vito L. di, Maccagno B., Broglio F., Boghen M. F., Deghenghi R., Camanni F., Ghigo E. [Effects of GHRP-2 and hexarelin, two synthetic GH-releasing peptides, on GH, prolactin, ACTH and cortisol levels in man. Comparison with

the effects of GHRH, TRH and hCRH]. *Peptides*, 1997, vol. 18, pp. 885-891. doi: 10.1016/S0196-9781(97)00016-8.

4. Okano M., Nishitani Y., Sato M., Ikekita A., Kageyama S. [Influence of intravenous administration of growth hormone releasing peptide-2 (GHRP-2) on detection of growth hormone doping: Growth hormone isoform profiles in Japanese male subjects]. *Drug Testing and Analysis*, 2010, vol. 2, pp. 548-556. doi: 10.1002/dta.166.

5. Ghigo E., Arvat E., Muccioli G., Camanni F. [Growth hormone-releasing peptides]. *European Journal of Endocrinology*, 1997, vol. 136, pp. 445-460. doi: 10.1530/eje.0.1360445.

6. Hashizume T., Tanabe Y., Ohtsuki K., Mori A., Matsumoto N., Hara S. [Plasma growth hormone (GH) responses after administration of the peptidergic GH secretagogue KP102 into the oral cavity, rumen, abomasum and duodenum in adult goats]. *Domestic animal endocrinology*, 2001, vol. 2001, pp. 37-46. doi:10.1016/S0739-7240(00)00087-4.

7. Thevis M., Schanzer W. E. [Drugs-Potential for misuse in sport and doping control detection strategies]. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2007, vol. 7, pp. 533-539. doi: 10.2174/138955707780619590.

8. The World Anti-Doping Code. The 2016 Prohibited List. International Standard for Laboratories. Available at: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2016-prohibited-list-en.pdf> (Accessed 22.03.2016).

9. Semenistaya E., Krotov G., Rodchenkov G. [Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin]. *Drug Testing and Analysis*, 2015, vol. 7, pp. 919-925. doi: 10.1002/dta.1787.

10. Thomas A., Kohler M., Mester J., Geyer H., Schaenzer W., Petrou M., Thevis M. [Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement]. *Drug testing and analysis*, 2010, vol. 2, pp. 144-148. doi: 10.1002/dta.120.

11. Thomas A., Walpurgis K., Krug O., Schänzer W., Thevis M. [Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry]. *Journal of Chromatography A*, 2012, vol. 1259, pp. 251-257. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.022.

12. Thomas A., Höppner S., Geyer H., Schänzer W., Petrou M., Kwiatkowska D., Thevis M. [Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry]. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 2011, vol. 401, pp. 507-516. doi: 10.1007/s00216-011-4702-3.

13. Gaudiano M. C., Valvo L., Borioni A. [Identification and quantification of the doping agent GHRP-2 in seized unlabelled vials by NMR and MS: a case-report]. *Drug testing and analysis*, 2014, vol. 6, pp. 295-300. doi: 10.1002/dta.1603.

14. Zhou S., Cook K.D. [Protonation in Electrospray Mass Spectrometry: Wrong-Way-Round or Right-Way-Round?]. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 2000, vol. 11, pp. 961-966. doi: 10.1016/S1044-0305(00)00174-4.

15. Virus E.D., Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M. ['Wrong-way-round ionization' and screening for doping substances in human urine by high performance liquid chromatography/orbitrap mass spectrometry]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012, vol. 47, pp. 381-391. doi: 10.1002/jms.2055.